



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 35/39	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/04169 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. März 1994 (03.03.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02178 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. August 1993 (16.08.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 27 066.9 16. August 1992 (16.08.92) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HERING, Bernhard, J. [DE/DE]; Friedrichstr. 35, D-35392 Gießen (DE). (74) Anwälte: ZUMSTEIN, F. usw. ; Bräuhausstr. 4, D-80331 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>
(54) Title: LANGERHANS' ISLETS IN PURE FORM (54) Bezeichnung: LANGERHANS'SCHE INSELN IN REINER FORM (57) Abstract <p>The invention relates to preparations of transplantable Langerhans' islets in particularly pure form, a novel production method and the therapeutic and/or diagnostic use of the islets.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Zubereitungen von transplantierfähigen Langerhans'schen Inseln in besonders reiner Form, ein neues Herstellungsverfahren sowie die therapeutische und/oder diagnostische Anwendung der Inseln.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakischen Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Langerhans'sche Inseln in reiner Form

Gegenstand der Erfindung ist eine Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 %, bezogen auf das Volumen der gereinigten zellulären Partikel, Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitung sowie die diagnostische und/oder therapeutische Anwendung dieser Zubereitung am menschlichen oder tierischen Körper.

Seit der Einführung des Insulins in die Diabetestherapie durch Banting und Best im Jahre 1922 ist das ketoazidotische Koma mit letalem Ausgang bei Diabetikern selten geworden. Die Behandlung mit Insulin hat bei der überwiegenden Mehrzahl der Erkrankten das Auftreten von diabetogenen Sekundärkomplikationen in Form von Mikroangiopathie u.a. an Auge, Nieren, und Nerven nicht verhindern können.

Seit 1966 wird versucht, die allseits bekannten Limitierungen der Insulintherapie durch Transplantation mit einer gesunden Bauchspeicheldrüse zu beheben. Die Risiken des chirurgischen Eingriffs und insbesondere die zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion lebenslang erforderliche immunsuppressive Behandlung des Empfängers rechtfertigen eine Pankreastransplantation als Wahleingriff nach Meinung namhafter Diabetologen nicht.

Seit langem war man bemüht, statt der Transplantation eines vollständigen Organs aus dem Pankreas von einem hirntoten Organspender, z.B. einem Unfallopfer, die Insulin-produzierenden Langerhans'schen Inseln zu isolieren und nur diese zu transplantieren, wobei deren Verabreichung in die Vena portae (Pfortader der Leber) im Vordergrund steht. Aus zahlreichen Tierversuchen ist bekannt, daß intraportal transplantierte Inseln in den Endästen der Portalvene einwachsen, die Insulinproduktion abhängig vom Bedarf, d.h. von der Höhe des Blutzuckerspiegels, aufnehmen, den diabetischen Stoffwechsel korrigieren und das Auftreten lebensbedrohender Diabeteskomplikationen verhindern. Ferner weiß man aus zahlreichen Tierversuchen, daß - bei Verwendung wenig immunogener Inseltransplantate - Inseltransplantationen im Gegensatz zur Pankreastransplantation keine oder nur eine vorübergehende immunsuppressive Behandlung des diabetischen Empfängers erforderlich ist.

Es liegen auch Erfahrungen mit der Inseltransplantation bei diabetischen Menschen vor. Lediglich eine Patientin wurde bislang für die Dauer von fast zwei Jahren nach Inseltransplantation Insulin-unabhängig (Warnock G.L. et al., Diabetologia 35: 89-95, 1992). Die Mißerfolge bei zahlreichen weiteren Versuchen werden mit der Transplantation von Inselsuspensionen mit unzureichender Reinheit erklärt, d.h. unzureichend erfolgter Abtrennung von Nicht-Inselgeweben wie exokrinen

Fragmenten, duktalem Elementen, Lymphknoten und Gefäßen. Solche Inselsuspensionen mit unzureichender Reinheit sind durch eine sehr hohe Immunogenität gekennzeichnet und nach Transplantation durch häufig auftretende Abstoßungsreaktionen bis hin zu vollständigen Transplantatverlust gefährdet. Trotz Verwendung immunsuppressiver Therapieprotokolle, welche sich bei der Transplantation von Herz, Leber und Niere bewährt haben, werden unreine Inselsuspensionen frühzeitig abgestoßen. Im Mittelpunkt des Interesses der Fachkreise stehen daher Reinigungsverfahren von transplantierfähigen Inselsuspensionen bzw. deren Präparation in besonders reiner Form aus Spenderorganen.

In der publizierten PCT-Anmeldung WO88/09667 ist ein Verfahren zur Gewinnung von gereinigten Zellsuspensionen aus Spenderorganen wie dem Pankreas beschrieben, indem man aus Gewebeverbänden herausgelöste Zellsuspensionen, wie Langerhans'sche Inseln enthaltende Suspensionen, der sogenannten Dichtegradientenzentrifugation unterwirft. In zahlreichen Publikationen, insbesondere in Übersichtsartikeln wie London N.J.M. et al.: Islet purification. In: Pancreatic Islet Cell Transplantation (Ricordi C., Editor), R.G. Landes, Austin, Texas, USA, pp 113-123, 1992, ist die spezielle Methodik der Dichtegradientenzentrifugation basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellen und/oder Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte (u.a. isopyknische Gradientenzentrifugation genannt) und deren Anwendung als Reinigungsverfahren für Suspensionen mit Zellverbänden von Langerhans'schen Inseln beschrieben, wobei Reinheitsgrade bis zu 90 %, bezogen auf das Volumen der gereinigten zellulären Partikel, erzielt werden. Die Verunreinigung der nach Anwendung dieser Methodik erhältlichen Inselsuspensionen mit unerwünschten zellulären Partikeln wie exokrinen Fragmenten, duktalem Elementen, Lymphknoten und Gefäßen ist unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung deutlich erkennbar.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit besonders hohem Reinheitsgrad herzustellen und die anhand eines Standardversuches in vitro nachweisbare Immunogenität zu mindern.

Diese Aufgabenstellung wird durch die vorliegende Erfindung gelöst, welche eine Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 %, bezogen auf das Volumen des gereinigten Zellmaterials, und das Herstellungsverfahren dieser Zubereitung betrifft.

Die Zubereitung der isolierten Langerhans'schen Inseln gemäß vorliegender Erfindung ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

Einen erhöhten Reinheitsgrad von Langerhans'schen Inseln verglichen mit Inselsuspensionen nach Anwendung nur einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte.

Die Zubereitung der isolierten Langerhans'schen Inseln gemäß vorliegender Erfindung ist außerdem durch folgende zusätzliche Merkmale gekennzeichnet:

Verlust von weniger als 3 % des Inselvolumens;
Durchmesser der Mehrzahl des gereinigten Zellmaterials größer als 100 µm;
Reduktion der Immunogenität um durchschnittlich mehr als 75 %;
Reduktion der potentiellen mikrobiologischen Kontamination;
Konstanz der mikrofluorometrischen Viabilitätsindizes;
Erhöhung der Glucose-stimulierten Insulinsekretionsindizes in-vitro um durchschnittlich mehr als 50 % sowie
Erhöhung der Wiederfindung des Inselvolumens nach einer oder mehreren immunmodulierenden Behandlungen.

Diese Merkmale ergeben sich im Vergleich mit vorgereinigten Inselsuspensionen nach Anwendung einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte, aber vor Anwendung einer anschließenden Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlichem Durchmesser, welche als erfinderisches Verfahrensmerkmal im folgenden noch näher beschrieben wird.

Als weiteres Merkmal kann noch der Amylasegehalt von weniger als 0,05% verglichen mit der Inselsuspension nach Herauslösung aus dem Gewebeverband des distendierten Pankreas und vor Anwendung von anschließend durchzuführenden Trennmaßnahmen genannt werden. Die Zubereitung enthält außerdem physiologisch annehmbare Trägerflüssigkeit.

Die Reinheit der Zubereitung der isolierten Langerhans'schen Inseln gemäß vorliegender Erfindung ist unter dem Lichtmikroskop deutlich erkennbar.

Die weiter vorn und im folgenden verwendeten allgemeinen Definitionen und Begriffe haben im Rahmen der Beschreibung der Erfindung die folgenden Bedeutungen:

Der Begriff Zellmaterial umfaßt zelluläre Fragmente oder Partikel, ganze Zellen und Agglomerationen von ganzen Zellen bis hin zu Agglomerationen von Zellen, welche auch Zellcluster genannt werden.

Die Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln ist nach dem im folgenden beschriebenen Verfahren aus dem tierischen oder menschlichen Spenderorgan Pankreas erhältlich und für diagnostische und/oder therapeutische Verfahren vorzugsweise am Menschen aber auch an Tieren applizierbar. Für therapeutische Verfahren zur Behandlung von Diabetes mellitus, sowohl vom Typ I als auch II, ist die Zubereitung der isolierten Langerhans'schen Inseln aus dem menschlichen Pankreas bevorzugt. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit von humanem Pankreas von Spendern und der hohen Prävalenz des Diabetes mellitus in der Bevölkerung wird auch tierisches Pankreas, insbesondere vom Schwein, bevorzugt. Für diagnostische Verfahren ist die Zubereitung von isolierten tierischen Langerhans'schen Inseln, insbesondere vom Schwein, bevorzugt. Die Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln aus dem menschlichen Pankreas für die diagnostische Anwendung ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Zubereitung liegt vorzugsweise in Form einer Suspension der isolierten Langerhans'schen Inseln in einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit

vor, die vorzugsweise parenteral in die Vena portae (Pfortader der Leber), aber auch in die Vena lienalis, in die Milzpulpa, unter die Nierenkapsel, in eine Omentumtasche, in das große Netz ("epiploic flap"), intraperitoneal, intramuskulär, subcutan, intracerebral oder intratesticulär injizierbar ist.

Der Begriff physiologisch annehmbare Trägerflüssigkeit definiert sämtliche wässrige Medien, die in der Literatur als geeignet für Reinigungs-, Diagnose- und Transplantationsverfahren von Langerhans'schen Inseln beschrieben sind. Bevorzugt sind Medien, die unter Bezeichnungen wie Hank's Balanced Saline Solution (Hanksche Lösung), Minimum Essential Medium, Medium 199, RPMI 1640, CMRL 1066, University of Wisconsin Solution etc. geläufig sind.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist das Herstellungsverfahren für die weiter vorn beschriebene Zubereitung der isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 % des Zellmaterials. Dieses Verfahren ist durch folgende Verfahrensmerkmale gekennzeichnet, daß man

- a) das Pankreas mit einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit, welche gegebenenfalls Collagenase und/oder weitere Proteasen enthält, distendiert und aus dem Gewebeverband Langerhans'sche Inseln mit zusätzlichem Zellmaterial durch Digestion herauslöst,
- b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln vom zusätzlichen Zellmaterial durch mindestens eine Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser abtrennt und gewünschtenfalls
- c) die erhaltenen Langerhans'schen Inseln einer ihre potentielle Immunogenität/Antigenität reduzierenden Behandlung unterwirft und/oder die behandelnden Inseln konserviert.

Verfahrensschritt a)

Dieser Verfahrensschritt ist an sich bekannt und findet generell bei den bekannten Isolierungs- und Reinigungsverfahren von Langerhans'scher Inseln Anwendung.

Der Begriff Distension bedeutet Aufdehnung. Zur Distension wird der Ausführungsgang des Pankreas, z.B. vom Mensch oder Schwein, über den im Körper die im exokrinen Anteil des Pankreas gebildeten Verdauungsenzyme in den Dünndarm abgegeben werden, kanüliert und über diese Kanüle werden meist 2 ml Hanksche Lösung mit ca. 0,1 - 1,0 % (w/v) Collagenase pro g Pankreas retrograd in den Pankreasgang injiziert. Dieser Verfahrensschritt wird vorzugsweise nach der von Lacy P.E. et al. in Diabetes 16: 35-39 (1967) und von Gray D.W.R. et al. in Diabetes 33: 1055-1061 (1984) beschriebenen Methodik durchgeführt.

Der Begriff Digestion bedeutet Verdauung. Während der Digestion wird das Pankreas unter enzymatischer und mechanischer Einwirkung in Langerhans'sche Inseln und Zellmaterial dissoziiert. Diese Maßnahme wird vorzugsweise nach der von Ricordi C. et al.: Diabetes 37: 413-420, 1988 sowie in der PCT-Anmeldung WO 88/09667 beschriebenen Methode durchgeführt.

Der Begriff Protease umfaßt neben reinen Collagenasen die unter Bezeichnung wie Neutral Protease, Clostripain, Trypsin, Elastase, Dispase etc. bekannten Enzyme.

Nach Durchführung des Verfahrensschrittes a) erhält man eine Suspension der herausgelösten Langerhans'schen Inseln in den weiter vorn definierten Medien, die noch durch zusätzliches Zellmaterial verunreinigt ist.

Verfahrensschritt b)

Der Begriff Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlichem Durchmesser definiert ein Trennverfahren, das an sich bekannt ist, dessen Anwendung zur Isolierung und Reinigung von Langerhans'schen Inseln noch neu und daher Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Diese Trennmaßnahme wird in internationalen Publikationen mit dem Begriff *velocity sedimentation* bezeichnet, die u.a. folgende Verfahrensvarianten umfaßt: Sedimentation bei 1 g, Gegenstromzentrifugation (Elutriation), Zentrifugation in reorientierenden Zonalrotoren und isokinetische Gradientenzentrifugation. Bevorzugt ist die unter der üblichen Bezeichnung "isokinetische Gradientenzentrifugation" bekannte Verfahrensvariante.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die isokinetische Gradientenzentrifugation mit einer weiteren Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte kombiniert.

Der Begriff Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte definiert ein weiteres Trennverfahren, das an sich bekannt ist und auch bei der Isolierung und Reinigung von Langerhans'schen Inseln angewendet worden ist, siehe Publikation von London N.J.M., loc. cit., Seite 5. Diese Trennmaßnahme ist in internationalen Publikationen auch unter dem Begriff isopyknische Gradientenzentrifugation beschrieben. Die bevorzugt anzuwendende Methodik wird im Beispiel näher erläutert.

Die besonders bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln von zusätzlichem Zellmaterial durch aufeinander folgende Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte und unterschiedlichem Durchmesser abtrennt.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens kann man umgekehrt vorgehen, indem man die Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser und unterschiedlicher Dichte miteinander kombiniert. Ebenfalls kann man beide Trennmaßnahmen in kontinuierlichen Verfahren miteinander kombinieren.

Die isokinetische Gradientenzentrifugation wird bevorzugt nach der von Pretlow T. G. in Anal Biochem 41: 248-255, 1971 und in der von Pretlow T. G. II und Pretlow T. P. in Cell Separation: Methods and Selected Applications, Vol. 5, Academic Press, pp 281-309, 1987 beschriebenen Methodik in einem physiologisch annehmbaren

wäßrigen Medium mit linearem Dichtegradienten durchgeführt. Ein solches Medium wird in Publikationen mit der Bezeichnung "Gradient" versehen und wird z.B. in einem sogenannten Gradientenmischer geformt oder bei der Zentrifugation selbst gebildet. Der Gradient hat am Boden des Zentrifugenröhrchens die größte Dichte und nimmt mit der Höhe an Dichte ab. Geeignete Medien zur Bildung von Gradienten sind z.B. unter der Bezeichnung Ficoll^R, Percoll^R (Pharmacia, Freiburg) bekannt und können Hilfsstoffe wie Polysucrose, Polyvinylpyrrolidon, Albumin oder Dextran enthalten. Für Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlichem Durchmesser ist die Migration des sedimentierenden Zellmaterials durch einen Gradienten charakteristisch, dessen maximale Dichte nicht größer ist als die des am wenigsten dichten sedimentierenden Materials. Während der Zentrifugation bewegt sich das sedimentierende Zellmaterial mit einer weitgehend konstanten Geschwindigkeit durch den Gradienten. Die Trennmaßnahme ist beendet, wenn die ersten zellulären Partikel den Boden des Zentrifugenröhrchens erreichen. Diese Methodik ist für Trennmaßnahmen von Zellmaterialien geeignet, die sich im wesentlichen durch ihren Durchmesser, aber weniger durch ihre Dichte unterscheiden.

Verfahrensschritt c)

Eine die potentielle Immunogenität/Antigenität reduzierende Behandlung, z.B. Kultivierung, UV-Bestrahlung, Gamma-Bestrahlung, Inkubation mit Antikörpern oder Verkapselung, betrifft übliche Aufarbeitungsverfahren von Zellmaterial in Kulturen für die weiter vorn beschriebenen Anwendungen, welche ebenfalls in den in dieser Anmeldung zitierten Publikationen beschrieben werden. Die Kryopräservierung kann sich bevorzugt als Konservierungsmaßnahme anschließen. Aufgrund der besonderen Reinheit der erhältlichen Inseln erzielt man nach Anwendung bei allen Maßnahmen, die sich an die Trennmaßnahmen anschließen, ein verbessertes Resultat, welches die therapeutischen und/oder diagnostischen Befunde verbessert.

Das folgende Beispiel illustriert die Erfindung, ohne dadurch diese zu limitieren (Temperaturangaben in Grad Celsius, die Ortsangaben der Hersteller bzw. der Herausgeber und Verlage von Publikationen beziehen sich auf in der Bundesrepublik Deutschland gelegene Orte):

Beispiel:**1. Pankreasgewebe.**

Das Pankreas wird in einem Schlachthaus bei einer Zuchtsau (Deutsches Bundeshybridzuchtprogramm, 240 kg, 34 Monate) nach Bolzenschuß, Entblutung und Entnahme des Darmsitus unter Schonung der Organkapsel aus dem umgebenden Fettgewebe unter sterilen Kautelen freipräpariert. Der Schlachtvorgang bedingt eine warme Ischämiezeit von 10 min. Das entnommene Organ wird in 4° kalter Eurocollins^R-Lösung (Fresenius, Bad Homburg) in das Insellabor transportiert. Die kalte Ischämiezeit vor Beginn der Inselisolierung beträgt 30 min.

2. Pankreaspräparation und Pankreasdistension.

Alle weiteren Schritte der Inselpräparation werden unter sterilen Kautelen ausgeführt. Nur der milznahe Schenkel des Pankreas wird für die Inselisolierung benutzt. Das Gewicht des präparierten Organsegmentes beträgt 120 g. Der Ausführungsgang der Bauchspeicheldrüse (Ductus pancreaticus) wird an der Schnittfläche zwischen milznahem und rechtem Schenkel aufgesucht, mit einer 19G-Kanüle kanüliert und die Kanüle mit einem chirurgischen Faden fixiert.

Das Gewicht des verwendeten milznahen Pankreasschenkels determiniert das Volumen der Distensionslösung. Pro Gramm Pankreas werden über die liegende Kanüle 2 ml Distensionslösung, d.h. insgesamt 240 ml, retrograd in den Ductus pancreaticus injiziert. Zur Distension wird University of Wisconsin (UW)-Lösung (DuPont, Bad Homburg) mit 0,4 % (wt/vol) Collagenase (Serva, Heidelberg, Katalog-Nr. 17449) benutzt, die Temperatur der Distensionslösung beträgt 22°.

Nach erfolgter Distension werden die Kanüle, weiteres umgebendes Fett- und Bindegewebe, die Organkapsel, und nicht distendiertes Parenchym entfernt (insgesamt 15 g ohne Kanüle, d.h. das Gewicht des weiter verwendeten Pankreas beträgt 105 g).

3. Pankreasdigestion.

Langerhans'sche Inseln (Inseln) werden nach einer von Ricordi C. et al.: Diabetes 37: 413-420, 1988 und ebenfalls in der publizierten PCT-Anmeldung WO 88/09667 für die Isolierung von humanen Langerhans'schen Inseln beschriebenen Methodik aus dem Gewebeverband zusammen mit exokrinen Fragmenten, Ductuselementen, Gefäßbruchstücken, Lymphknoten etc. herausgelöst.

Zu diesem Zweck wird das distendierte Pankreassegment in den unteren Teil einer 450 ml Digestions-Kammer, deren Anordnung in der PCT-Anmeldung WO 88/09667 beschrieben ist, zusammen mit sieben Glaskugeln gegeben. Anschließend werden der untere Teil der Kammer, ein Sieb mit einer

Porengröße von 400 μm , der Deckel der Kammer sowie ein Schlauchsystem zur Rezirkulation der Collagenaselösung wie in Abb. 2 der PCT-Anmeldung WO 88/09667 beschrieben, zusammengefügt.

Man füllt das Schlauchsystem mit zusätzlicher Hankschen Lösung, schaltet die Pumpe zur Rezirkulation der Lösung ein und stellt die Durchflußgeschwindigkeit (flow rate) auf 200 ml/min. Man bewegt die Digestions-Kammer mit dem distendierten Pankreas und den Glaskugeln in der vertikalen Achse mit einer Frequenz von 300 Oszillationen pro min. und einer Amplitude von 10 mm. Man erhöht die in der Digestionskammer gemessene Temperatur mittels eines Wärmetauschers um 3°/min. auf 32-34° und hält die Temperatur während der Rezirkulationsphase (Phase I) bei diesem Wert konstant.

Anhand mikroskopischer Beobachtung von Proben, welche im Abstand von 1-2 min. aus dem Schlauchsystem entnommen werden, läßt sich der Fortgang der Pankreasdigestion verfolgen. Nach 14 min. wird erstmals eine große Zahl freier Inseln in einer entnommenen Probe identifiziert. Man stoppt die Rezirkulation der Collagenase-haltigen Hankschen Lösung zu diesem Zeitpunkt und spült die Kammer 15 min. mit frischer, enzymfreier Hankschen Lösung mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 250 ml/min, bis in den Proben keine Inseln sichtbar sind (Phase II). Die Temperatur während Phase II nimmt von 32-34° innerhalb von 15 min auf 15° ab. Um die freiwerdenden Inseln vor der Einwirkung der Collagenase und weiterer, aus dem Pankreas freigesetzter proteolytischer Enzyme zu schützen, nimmt man die Gewebesuspension in gekühlten (8°) 250 ml Zentrifugenbechern mit konischem Boden auf, in die 35 ml Hanksche Lösung vorlegt.

Man zentrifugiert diese mit Gewebesuspension gefüllten Zentrifugenbecher 2 min. lang bei 4° in einem Schwerfeld von 120 x g, verwirft den Überstand, füllt das Gesamtpellet auf 200 ml mit UW-Lösung (4°) auf, resuspendiert und lagert bei 8°C.

Zur Bestimmung der Inselzahl, des Inselvolumens, des DNA-Gehaltes, der Insulin-Konzentration und der Amylaseaktivität werden repräsentative Proben entnommen.

4. Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation

Nach nochmaliger Zentrifugation (2 min. bei 4° in einem Schwerfeld von 120 x g) verwirft man den Überstand, resuspendiert das Pellet mit einem Volumen von 32 ml in 15 ml hitzeinaktiviertem Newborn Calf Serum (NCS, Biochrom, Berlin) und überführt in ein 600 ml Becherglas, welches man mit 400 ml Ficoll-Natriumdiatrizoat-Lösung auffüllt. Man stellt diese Lösung durch Zusammengeben von 500 ml Seromed^R-Ficolltrennmittel (1,090 g/cm³, Biochrom, Berlin), 12 ml HEPES 1M (Gibco, Eggenstein), 5ml Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ml P., 10.000 μg /ml S., Flow, Irvine, GB), 1 ml 1 N NaOH und 50 ml Medium 199 (1x, Biochrom, Berlin) her. Man überführt den Inhalt des Becherglases (Bodenschicht) in einen 500 ml-Bluttransportbeutel (Modell Biopack, Biotrans, Dreieich), verbindet diesen Bluttransportbeutel mit einem zuvor in das Blutzellwaschgerät 2991 (Cobe, Kirchheim/München)

gemäß Vorschrift eingelegten Einmalsystem (Blood Cell Processor Processing Set, Cobe, Katalog-Nr. 912-647-819) und füllt den Inhalt des Bluttransportbeutels in das Einmalsystem ein. Man beschleunigt die Zentrifuge des Blutzellwaschgerätes 2 min. lang auf 2000 rpm (rotations per minute). Man schichtet 200 ml Medium 199 auf die Bodenschicht mit einer Schlauchpumpe bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/min. auf, während man die Zentrifuge auf 2400 rpm beschleunigt. Anschließend entlüftet man das Einmalsystem und verschließt den Zuführungsschlauch. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2400 rpm und Raumtemperatur werden bei derselben Umdrehungszahl mit einem integrierten "Gradientenunloader" nacheinander folgende Fraktionen aus dem "Processing Set" in Zentrifugenbecher überführt:

Fraktion I:	180 ml
Fraktion IIa:	25 ml
Fraktion IIb:	10 ml
Fraktion IIc:	10 ml
Fraktion IId:	10 ml
Fraktion IIe:	25 ml
Fraktion III:	290 ml.

Nach Abstellen der Zentrifuge entnimmt man das "Processing Set" und überführt die

Fraktion IV:	50 ml
--------------	-------

in ein Becherglas.

Die Fraktionen werden in Medium 199 mit 10%-igem NCS suspendiert und 5 min. lang bei 250 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Man verwirft den Überstand, resuspendiert das Pellet der Fraktionen separat in Leibovitz-Medium (Biochrom, Berlin) mit 10%-igem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), 1%-iger Penicillin-Streptomycin Lösung und 2 mM Glucyl-Glutamin (Biochrom, Berlin), überführt die Suspensionen in Kulturflaschen und beurteilt die Suspensionen hinsichtlich ihrer Inselreinheit (prozentualer Anteil der mit Inselgewebe bedeckten Oberfläche). Die Fraktionen, die die Masse des Volumens der Inseln enthalten, sind nahezu ohne exokrine Kontamination und werden anschließend der isokinetischen Gradientenzentrifugation zugeführt.

Zur Bestimmung der Inselzahl, des Inselvolumens, des DNA-Gehaltes, der Insulin-Konzentration, der Amylase-Aktivität, der Glukose-abhängigen Insulinsekretion in-vitro sowie der Immunogenität werden repräsentative Proben entnommen.

5. Isokinetische Gradientenzentrifugation

In 100 ml-Rundboden-Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat mit einer Höhe von 166 mm und einem Durchmesser von 31,5 mm (Nalge, Braunschweig) werden eine Bodenschicht (Kissen) mit einem Volumen von 4 ml, einer Höhe

von 15 mm, einer Dichte von $1,026 \text{ g/cm}^3$ und einer Viskosität von 3,5 cP bei 16° bestehend aus FICOLL und Leibovitz-Medium pipettiert.

Auf die Bodenschicht (das Kissen) wird mit Hilfe eines Zweikammer-Gradientenformers ein kontinuierlicher Gradient mit einem Volumen von 76 ml und einer Höhe von 120 mm, einem Dichtebereich von 1,026 bis $1,017 \text{ g/cm}^3$ und einem Viskositätsbereich von 3,5 cP bis 2,0 cP bei 16° bestehend aus FICOLL und Leibovitz-Medium aufgeschichtet.

Auf den kontinuierlichen Gradienten wird eine 5 ml Probe entsprechend einer Höhe von 8 mm und bis zu 50.000 Inseläquivalenten (ein Inseläquivalent ist eine volumenkorrigierte Inselzahl, ein Inseläquivalent repräsentiert eine Insel mit einem Durchmesser von $150 \mu\text{m}$, siehe Ricordi C et al. Acta Diabetol Lat 27: 185-195, 1990) und zellulärer Restmasse in Leibovitz Medium hinzugefügt.

Die Zentrifugenröhrchen mit Bodenschicht (Kissen), Gradienten und Probe werden so in eine Zentrifuge positioniert, daß der Abstand der Grenzschicht zwischen Kissen und Gradienten 22,2 cm und der Abstand der Grenzschicht zwischen Probe und Gradienten 10,2 cm vom Zentrum der Hettich Rotixa RP Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) beträgt, welche mit einem Ausschwingrotor Typ 5094 und passenden Gehängen und Reduzierungen zur Aufnahme von 100 ml-Zentrifugenröhrchen versehen ist. Gegenüberliegend werden weitere Zentrifugenröhrchen gleichen Inhaltes oder Balanceröhrchen positioniert.

Man beschleunigt die Zentrifugenröhrchen 30 sec. lang bis auf 490 rpm. Bei dieser Drehzahl wirkt eine Zentrifugalkraft von $27,4 \times g$ an der Grenzschicht zwischen Probe und Gradienten und von $59,6 \times g$ an der Grenzschicht zwischen der Bodenschicht und Gradienten. Man zentrifugiert bei 16° 60 sec. lang und bremst in 30 sec. bis auf 0 rpm ab.

Man entnimmt die Zentrifugenröhrchen der Zentrifuge, aspiriert die erste Fraktion bestehend aus 80 ml und die zweite Fraktion bestehend aus 5 ml, verdünnt mit Leibovitz Medium und wäscht durch erneute Zentrifugation 2 min. bei $120 \times g$ und 16° . Man verwirft den Überstand und resuspendiert die verbleibende Zellsuspension mit Leibovitz Medium oder anderen Kultur-Medien und konventionellen Zusätzen.

Zur Bestimmung der Inselzahl, des Inselvolumens, des DNA-Gehaltes, der Insulin-Konzentration der Amylaseaktivität, der Glukose-abhängigen Insulinsekretion in-vitro sowie der Immunogenität werden repräsentative Proben entnommen.

Die erhältliche Inselsuspension wird der weiteren Verwendung, z.B. Kultur, zugeführt.

6. Prüfung

Die Inselzahl, das Inselvolumen, die Insulinkonzentration, der mikrofluorometrische Viabilitätstest, die Glucose-abhängige Insulinsekretion in-vitro werden in den einzelnen Proben nach internationalem Standard bestimmt (Ricordi C. et al. Acta Diabetol. Lat., loc. cit.). Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgt nach der Methode von Labarca C. und Paigen K., Anal Biochem 102: 344-352, 1980. Die Amylaseaktivität der einzelnen Proben wird mit dem α -Amylase EPSR-Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) bestimmt. Zur Erfassung der Immunogenität wird eine gemischte Lymphozyten-Insel-Kultur durchgeführt, siehe Ulrichs K. et al.: Horm. Metabol. Res. 25/S: 123-127, 1990). 100 Schweineinseln werden zusammen mit 10^5 humanen Lymphozyten drei Tage lang bei 37° kultiviert, anschließend nach Zugabe von $10 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$ kokultiviert man 20 h. lang Inseln und xenogene Lymphozyten. Die Lymphozytenproliferation korreliert mit dem $^3\text{H-Thymidin}$ -Einbau und wird mit einem β -Counter als "counts per minute" und unter Berücksichtigung von Kontrollwerten nach Umrechnung als Stimulationsindex ausgedrückt.

Tab. 1 Ergebnisse einer Zubereitung Langerhansscher Inseln aus dem Pankreas eines Schweines mit Anwendung von zwei aufeinander folgenden Reinigungsverfahren (isopyknische und isokinetische Gradientenzentrifugation)

	vor IPGZ	nach IPGZ	vor IKGZ	nach IKGZ
Inselzahl	219 985	156 849	152 332	99 016
Inselvolumen (µl)	623	458	445	432
Amylase (U)	729 644 760	402 773	165 916	72 748
Insulin (U)	379,6	236,3	212,6	151,5
DNA (mg)	365 508	6 643	2 321	1 820
Viabilität (%)	--	98,7	--	98,5
Perifusion	--	PI: 0,48	--	PI: 4,44
Immunogenität (Stim.-Index)	--	28,5	--	2,3
in %:	vor IPGZ	nach IPGZ	vor IKGZ	nach IKGZ
Inselzahl	100%	71,3%	69,2%	45,0%
Inselvolumen	100%	73,5%	71,4%	69,3%
Amylase	100%	0,055%	0,023%	0,010%
Insulin	100%	62,2%	56,9%	39,9%
DNA	100%	1,82%	0,63%	0,50%

Tab. 2 Ergebnisse weiterer Inselzubereitungen aus dem Schweinepankreas (n=9) mit Anwendung von zwei aufeinander folgenden Reinigungsverfahren (isopyknische und isokinetische Gradientenzentrifugation)

Mittelwerte ± SEM	nach IPGZ	nach IKGZ
Inselvolumen (µl)	321 ± 44,2	315,5 ± 39,4
Viabilität (%)	99,2 ± 0,3	99,1 ± 0,4
Immunogenität (Stimulationsindex nach IPGZ = 100%)	100%*	24,4% ± 6,4%*

IPGZ: isopyknische Zentrifugation

IKGZ: isokinetische Zentrifugation

PI: Perifusionsindex

* Unterschiede der Stimulationsindices hochsignifikant (p < 0,001)

Ansprüche:

1. Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 %, bezogen auf das Volumen des gereinigten Zellmaterials, gekennzeichnet durch:
einen erhöhten Reinheitsgrad der Langerhans'scher Inseln verglichen mit Inselsuspensionen nach Anwendung nur einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte;
Verlust von weniger als 3 % des Inselvolumens;
Durchmesser der Mehrzahl des gereinigten Zellmaterials größer als 100 µm;
Reduktion der Immunogenität um durchschnittlich mehr als 75%;
Reduktion der potentiellen mikrobiologischen Kontamination;
Konstanz der mikrofluorometrischen Viabilitätsindizes;
Erhöhung der Glukose-stimulierten Insulinsekretionsindices in-vitro um durchschnittlich mehr als 50 % sowie
Erhöhung der Wiederfindung des Inselvolumens nach einer oder mehrerer immunmodulierender Behandlungen, jeweils verglichen mit vorgereinigten Inselsuspensionen nach Anwendung einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte, aber vor Anwendung einer anschließenden Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlichem Durchmesser;
Amylasegehalt von weniger als 0,05% verglichen mit der Inselsuspension nach Herauslösung aus dem Gewebeverband des distendierten Pankreas und vor Anwendung von anschließend durchzuführenden Trennmaßnahmen;
und physiologisch annehmbare Trägerflüssigkeit.
2. Zubereitung gemäß Anspruch 1 von isolierten humanen Langerhans'schen Inseln.
3. Zubereitung gemäß Anspruch 1 von isolierten tierischen Langerhans'schen Inseln.
4. Zubereitung gemäß Anspruch 3 von isolierten Langerhans'schen Inseln des Schweines.
5. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in Form einer parenteral injizierbaren Suspension.
6. Zubereitung gemäß Anspruch 5 in Form einer in die Vena portae injizierbaren Suspension.
7. Zubereitung gemäß Anspruch 5 in Form einer in die Vena lienalis, in die Milzpulpa, unter die Nierenkapsel, in eine Omentumtasche, in eine "epiploic flap", intraperitoneal, intramuskulär, subcutan, intracerebral oder intratesticulär injizierbaren Suspension.

8. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 % des Zellmaterials, bezogen auf das Volumen der gereinigten zellulären Partikel, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das Pankreas mit einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit, welche gegebenenfalls Collagenase und/oder weitere Proteasen enthält, distendiert und aus dem Gewebeverband Langerhans'sche Inseln mit zusätzlichem Zellmaterial herauslöst,
 - b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln vom zusätzlichen Zellmaterial durch mindestens eine Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser abtrennt und gewünschtenfalls
 - c) die erhältlichen Langerhans'schen Inseln einer ihre potentielle Immunogenität/Antigenität reduzierenden Behandlung unterwirft und/oder die behandelten Inseln konserviert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das Pankreas mit einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit, welche gegebenenfalls Collagenase enthält, distendiert.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) aus dem Gewebeverband des distendierten Pankreas durch enzymatische und gegebenenfalls mechanische Einwirkung Langerhans'sche Inseln mit zusätzlichen zellulären Partikeln herauslöst.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) als Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser die isokinetische Gradientenzentrifugation anwendet.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isokinetische Gradientenzentrifugation in einem physiologisch annehmbaren wäßrigen Medium mit linearem Dichtegradienten durchführt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isokinetische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium enthaltend Polysucrose mit einem Molekulargewicht von ca. 400.000 durchführt.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) ein geeignetes Gefäß mit einer Bodenschicht bestehend aus einem Kolloid und einem physiologisch annehmbaren wäßrigen Medium versieht, darauf weiteres Medium, welches in dem eingenommenen Volumen einen kontinuierlichen Gradienten mit einem Dichtebereich von ca. 1,005 bis 1,600 g/cm³ und einem Viskositätsbereich von ca. 1,1 bis 15 cP bei ca. 4°C bis 37°C aufweist, aufschichtet, und die nach Verfahrensschritt a) erhältliche

Suspension von Langerhans'schen Inseln mit zusätzlichem Zellmaterial hinzugefügt.

15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln von zusätzlichem Zellmaterial durch aufeinander folgende Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte und unterschiedlichem Durchmesser abtrennt.
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) als Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte die isopyknische Gradientenzentrifugation anwendet.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isopyknische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium mit diskontinuierlichem Dichtegradienten durchführt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isopyknische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium enthaltend Polysucrose mit einem Molekulargewicht von ca. 400.000 und Natriumdiatrizoat durchführt
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - c) die erhältlichen Langerhans'schen Inseln in ihrer potentiellen Immunogenität/Antigenität durch eine Nachbehandlung aus der Gruppe der üblichen Verfahren bestehend aus Kultivierung, UV-Bestrahlung, Gamma-Bestrahlung, Inkubation mit Antikörpern oder Verkapselung reduziert.
20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - c) die erhältlichen Langerhans'schen Inseln durch Kultur und/oder Kryopräservierung konserviert.
21. Die nach den Verfahren gemäß Anspruch 8 erhältlichen Langerhans'schen Inseln.
22. Zubereitung gemäß Anspruch 1 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Anwendung am menschlichen oder tierischen Körper.
23. Zubereitung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung des Diabetes mellitus am Menschen.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 27. Januar 1994 (27.01.94) eingegangen, ersetzt; neuer Anspruch 1 hinzugefügt; alle weiteren Ansprüche unverändert und umnummeriert 2-24 (3 seiten)]

1. Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 %, bezogen auf das Volumen des gereinigten Zellmaterials.
2. Zubereitung gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch:
 - einen erhöhten Reinheitsgrad der Langerhans'scher Inseln verglichen mit Inselsuspensionen nach Anwendung nur einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte;
 - Verlust von weniger als 3 % des Inselvolumens;
 - Durchmesser der Mehrzahl des gereinigten Zellmaterials größer als 100 µm;
 - Reduktion der Immunogenität um durchschnittlich mehr als 75%;
 - Reduktion der potentiellen mikrobiologischen Kontamination;
 - Konstanz der mikrofluorometrischen Viabilitätsindizes;
 - Erhöhung der Glukose-stimulierten Insulinsekretionsindices in-vitro um durchschnittlich mehr als 50 % sowie
 - Erhöhung der Wiederfindung des Inselvolumens nach einer oder mehrerer immunmodulierender Behandlungen, jeweils verglichen mit vorgereinigten Inselsuspensionen nach Anwendung einer Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte, aber vor Anwendung einer anschließenden Trennmaßnahme vorwiegend basierend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlichem Durchmesser;
 - Amylasegehalt von weniger als 0,05% verglichen mit der Inselsuspension nach Herauslösung aus dem Gewebeverband des distendierten Pankreas und vor Anwendung von anschließend durchzuführenden Trennmaßnahmen;
 - und physiologisch annehmbare Trägerflüssigkeit.
3. Zubereitung gemäß Anspruch 1 von isolierten humanen Langerhans'schen Inseln.
4. Zubereitung gemäß Anspruch 1 von isolierten tierischen Langerhans'schen Inseln.
5. Zubereitung gemäß Anspruch 4 von isolierten Langerhans'schen Inseln des Schweines.
6. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in Form einer parenteral injizierbaren Suspension.
7. Zubereitung gemäß Anspruch 6 in Form einer in die Vena portae injizierbaren Suspension.
8. Zubereitung gemäß Anspruch 6 in Form einer in die Vena lienalis, in die Milzpulpa, unter die Nierenkapsel, in eine Omentumtasche, in eine "epiploic flap", intraperitoneal, intramuskulär, subcutan, intracerebral oder intratesticulär injizierbaren Suspension.

9. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 % des Zellmaterials, bezogen auf das Volumen der gereinigten zellulären Partikel, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das Pankreas mit einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit, welche gegebenenfalls Collagenase und/oder weitere Proteasen enthält, distendiert und aus dem Gewebeverband Langerhans'sche Inseln mit zusätzlichem Zellmaterial herauslöst,
 - b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln vom zusätzlichen Zellmaterial durch mindestens eine Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser abtrennt und gewünschtenfalls
 - c) die erhaltlichen Langerhans'schen Inseln einer ihre potentielle Immunogenität/Antigenität reduzierenden Behandlung unterwirft und/oder die behandelten Inseln konserviert.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das Pankreas mit einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit, welche gegebenenfalls Collagenase enthält, distendiert.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) aus dem Gewebeverband des distendierten Pankreas durch enzymatische und gegebenenfalls mechanische Einwirkung Langerhans'sche Inseln mit zusätzlichen zellulären Partikeln herauslöst.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) als Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlichem Durchmesser die isokinetische Gradientenzentrifugation anwendet.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isokinetische Gradientenzentrifugation in einem physiologisch annehmbaren wäßrigen Medium mit linearem Dichtegradienten durchführt.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isokinetische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium enthaltend Polysucrose mit einem Molekulargewicht von ca. 400.000 durchführt.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) ein geeignetes Gefäß mit einer Bodenschicht bestehend aus einem Kolloid und einem physiologisch annehmbaren wäßrigen Medium versieht, darauf weiteres Medium, welches in dem eingenommenen Volumen einen kontinuierlichen Gradienten mit einem Dichtebereich von ca. 1,005 bis 1,600 g/cm³ und einem Viskositätsbereich von ca. 1,1 bis 15 cP bei ca. 4°C bis 37°C aufweist, aufschichtet, und die nach Verfahrensschritt a) erhaltliche

Suspension von Langerhans'schen Inseln mit zusätzlichem Zellmaterial hinzugefügt.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die herausgelösten Langerhans'schen Inseln von zusätzlichem Zellmaterial durch aufeinander folgende Trennmaßnahmen basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellverbänden mit unterschiedlicher Dichte und unterschiedlichem Durchmesser abtrennt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) als Trennmaßnahme basierend vorwiegend auf unterschiedlicher Sedimentation von Zellmaterial mit unterschiedlicher Dichte die isopyknische Gradientenzentrifugation anwendet.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isopyknische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium mit diskontinuierlichem Dichtegradienten durchführt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - b) die isopyknische Gradientenzentrifugation in einem wäßrigen Medium enthaltend Polysucrose mit einem Molekulargewicht von ca. 400.000 und Natriumdiatrizoat durchführt
20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - c) die erhältlichen Langerhans'schen Inseln in ihrer potentiellen Immunogenität/Antigenität durch eine Nachbehandlung aus der Gruppe der üblichen Verfahren bestehend aus Kultivierung, UV-Bestrahlung, Gamma-Bestrahlung, Inkubation mit Antikörpern oder Verkapselung reduziert.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - c) die erhältlichen Langerhans'schen Inseln durch Kultur und/oder Kryopräservierung konserviert.
22. Die nach den Verfahren gemäß Anspruch 9 erhältlichen Langerhans'schen Inseln.
23. Zubereitung gemäß Anspruch 1 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Anwendung am menschlichen oder tierischen Körper.
24. Zubereitung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung des Diabetes mellitus am Menschen.

IN ARTIKEL 19 GENANNT ERKLÄRUNG

Der neu zugefügte Patentanspruch 1 ist auf die Zubereitung gerichtet, wie sie in der Beschreibung auf Seite 2, 4. Absatz, angegeben ist. Er hat einen etwas weniger eingeschränkten Umfang als der frühere Patentanspruch 1 (jetziger Anspruch 2). Auch dieser Anspruchsgegenstand ist gegenüber dem Stand der Technik neu, da in keiner der Literaturstellen, die im internationalen Recherchenbericht genannt sind, ein Reinheitsgrad von mehr als 98 % beschrieben wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 93/02178A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K35/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 92 1991, Philadelphia, PA, US; abstract no. 98540, MARCHETTI, PIERO ET AL. 'AUTOMATED LARGE-SCALE ISOLATION, IN VITRO FUNCTION AND XENOTRANSPLANTATION OF PORCINE ISLETS OF LANGERHANS' see abstract & TRANSPLANTATION vol. 52, no. 2, 1991 pages 209 - 213 ---	1,3, 8-11, 15-18, 21-23
Y	EP,A,0 191 613 (WASHINGTON UNIVERSITY) 20 August 1986 see page 25, line 4 - page 27, line 4 --- -/--	1-3, 8-11, 15-18, 21-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1993

Date of mailing of the international search report

07. 12. 93

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

REMPP, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 93/02178

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DIABETES vol. 38, no. SUP1 , January 1989 pages 136 - 139 GARTH L. WARNOCK ET AL. 'VIABLE PURIFIED ISLETS OF LANGERHANS FROM COLLAGENASE-PERFUSED HUMAN PANCREAS' DAS GANZE ARTIKEL ---	1,2, 8-11, 15-18, 21-23
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 79, no. 3 , 1977 , DULUTH, MINNESOTA US pages 823 - 828 ANTONIO BUITRAGO, ET AL. 'RAPID ISOLATION OF PANCREATIC ISLETS FROM COLLAGENASE DIGESTED PANCREAS BY SEDIMENTATION THROUGH PERCOLL TM AT UNIT GRAVITY' DAS GANZE ARTIKEL -----	1-3, 8-11, 15-18, 21-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 93/02178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0191613	20-08-86	US-A- 4868121	19-09-89
		JP-A- 61183226	15-08-86

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61K35/39

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 92 1991, Philadelphia, PA, US; abstract no. 98540, MARCHETTI, PIERO ET AL. 'AUTOMATED LARGE-SCALE ISOLATION, IN VITRO FUNCTION AND XENOTRANSPLANTATION OF PORCINE ISLETS OF LANGERHANS' siehe Zusammenfassung & TRANSPLANTATION Bd. 52, Nr. 2, 1991 Seiten 209 - 213 ---	1,3, 8-11, 15-18, 21-23
Y	EP,A,0 191 613 (WASHINGTON UNIVERSITY) 20. August 1986 siehe Seite 25, Zeile 4 - Seite 27, Zeile 4 ---	1-3, 8-11, 15-18, 21-23
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. November 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07. 12. 93

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

REMPP, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DIABETES Bd. 38, Nr. SUP1 , Januar 1989 Seiten 136 - 139 GARTH L. WARNOCK ET AL. 'VIABLE PURIFIED ISLETS OF LANGERHANS FROM COLLAGENASE-PERFUSED HUMAN PANCREAS' DAS GANZE ARTIKEL</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2, 8-11, 15-18, 21-23</p>
Y	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. Bd. 79, Nr. 3 , 1977 , DULUTH, MINNESOTA US Seiten 823 - 828 ANTONIO BUITRAGO, ET AL. 'RAPID ISOLATION OF PANCREATIC ISLETS FROM COLLAGENASE DIGESTED PANCREAS BY SEDIMENTATION THROUGH PERCOLL TM AT UNIT GRAVITY' DAS GANZE ARTIKEL</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-3, 8-11, 15-18, 21-23</p>

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 93/02178

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)